

基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱法快速测定米饭和乳制品中蜡样芽孢杆菌呕吐毒素Cereulide

曾羲^{1,2}, 王宇^{1,2}, 徐巨才³, 黄穗东², 王涓¹, 徐振林^{1,*}

(1.华南农业大学食品学院, 广东省食品质量安全重点实验室, 广东 广州 510642; 2.广州市食品检验所, 广东 广州 511400; 3.五邑大学生物科技与大健康学院, 江门市大健康国际创新研究院, 广东 江门 529020)

摘要: 建立基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 法分析蜡样芽孢杆菌呕吐毒素Cereulide的快速检测方法。分析了Cereulide标准物质的裂解规律, 考察基质种类、点靶方式、基质溶剂和用量、激光强度等对Cereulide的质谱信号强度的影响, 并进行方法学验证和实际样品检测。结果表明, 选择以 α -氰基-4-羟基肉桂酸为基质, 均匀分散在50%乙腈-水 (含0.1%三氟乙酸) 中, 采用先点基质再点样品的点样方式, 反射线性正离子模式下选择激光强度70%进行食品中MALDI-TOF MS筛查时, 可检测到Cereulide的 $[M+Na]^+$ 和 $[M+K]^+$ 目标离子峰, 此质谱信号稳定、强度高、响应重复性好。方法学验证结果表明, Cereulide的 $[M+Na]^+$ 和 $[M+K]^+$ 目标离子峰在5~100 ng/mL范围内线性好, 相关系数 (r) >0.99; 方法的检出限分别为3.0 ng/g和5.0 ng/g; 对米饭和牛乳样品的加标回收率为73.3%~118.2%, 相对标准偏差为0.3%~10.9% ($n=6$)。本方法分析速度快、准确性高、灵敏度好、抗干扰能力强、无需内标即可实现对米饭和乳制品中Cereulide的批量筛查和检测。

关键词: 基质辅助激光解吸-电离飞行时间质谱; 蜡样芽孢杆菌; 呕吐毒素; α -氰基-4-羟基肉桂酸

Fast Detection of the Emetic Toxin Cereulide in Cooked Rice and Dairy Products by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry

ZENG Xi^{1,2}, WANG Yu^{1,2}, XU Jucan³, HUANG Suidong², WANG Juan¹, XU Zhenlin^{1,*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Guangzhou Institute for Food Control, Guangzhou 511400, China; 3. International Healthcare Innovation Institute (Jiangmen), School of Biotechnology and Health Science, Wuyi University, Jiangmen 529020, China)

Abstract: A matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) method was developed for the rapid detection of the emetic toxin cereulide in cooked rice and dairy products. The splitting pattern of cereulide standard was analyzed, meanwhile, effects of matrix type, spotting methods, the type and dosage of matrix solvent, and laser intensity on the MS signal intensity of cereulide were investigated. Methodological validation and application to actual samples were conducted. As a result, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) was chosen as the matrix and dispersed in a 1:1 acetonitrile-water mixture containing 0.1% trifluoroacetic acid, and the matrix and the samples were sequentially spotted. In MALDI-TOF MS screening of foods using positive ion reflectron and linear modes at 70% laser intensity, the target ion peaks of $([M+Na]^+$ and $[M+K]^+)$ in cereulide were detected with stable signals, high intensity and good response repeatability. The results of methodological validation showed that good linear relationship was observed between the overlapping areas of $[M+Na]^+$ and $[M+K]^+$ peaks and cereulide concentration in the range from 5 to 100 ng/mL, with a correlation coefficients (r) greater than 0.99. The limits of detection (LOD) of $[M+Na]^+$ and $[M+K]^+$ were 3.0 and

收稿日期: 2023-02-07

基金项目: 广东省基础与应用基础研究重大项目 (2020B0301030005);

广东省基础与应用基础研究基金项目 (2023A1515012605; 2019B1515210025);

广东省普通高校重点领域专项 (2022ZDZX2004); 广东省市场监督管理局科技项目 (2023CS01)

第一作者简介: 曾羲 (1991—) (ORCID: 0000-0003-4352-3306), 女, 工程师, 硕士, 研究方向为食品质量安全检测与营养分析评价。E-mail: lovelyzeng@126.com

*通信作者简介: 徐振林 (1982—) (ORCID: 0000-0002-1197-4615), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品安全检测与控制。E-mail: jallent@163.com

5.0 ng/g, respectively; the recoveries of spiked rice and milk samples were ranged from 73.3% to 118.2%, with relative standard deviations (RSDs) of 0.3% to 10.9% ($n = 6$). This method was characterized by rapidity, high accuracy, good sensitivity, and strong anti-interference ability, and was suitable for the detection of cereulide in cooked rice and dairy products without using any internal standard.

Keywords: matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; *Bacillus cereus*; cereulide; α -cyano-4-hydroxycinnamic acid

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230207-064

中图分类号: TS201.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 01-0232-07

引文格式:

曾羲, 王宇, 徐巨才, 等. 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱法快速测定米饭和乳制品中蜡样芽孢杆菌呕吐毒素 Cereulide[J]. 食品科学, 2024, 45(1): 232-238. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230207-064. <http://www.spkx.net.cn>

ZENG Xi, WANG Yu, XU Jucai, et al. Fast detection of the emetic toxin cereulide in cooked rice and dairy products by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry[J]. Food Science, 2024, 45(1): 232-238. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230207-064. <http://www.spkx.net.cn>

蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*, Bc) 是一种在自然环境广泛分布、可产芽孢的革兰氏阳性杆菌^[1-2], 也是一种检出率极高的条件食源性致病菌^[3-4], 其在食品的污染率高达20%~40%, 且大部分阳性样的污染水平远超现在国家限量标准^[5-7]。Bc的多个致吐毒株可分泌产生对酸、碱及热稳定的环状型呕吐毒素Cereulide (图1), 被认为是亚洲“炒饭综合征”的罪魁祸首^[8]。Cereulide为十二环肽, 其不受蛋白酶干扰, 且对自然杀伤细胞有作用抑制, 会影响免疫功能和引发急性肝衰竭^[9-11], 在Bc活菌被消除的情况下依然可引起食物中毒^[12]。仅被Cereulide污染的食品不会发生腐败变质、无异味, 有极大的食品安全隐患, 2017年我国由Bc引发的食物中毒总人数比例高达3.63%^[13]; 2019年我国即食食品样本中Bc的检出率高达35.1%^[8]; 有研究表明, 体质量约70 kg的成年人食用含有0.01~1.28 μg Cereulide的食物即可发生呕吐中毒^[14]。因此, 建立食品中低浓度Cereulide的快速高效分析筛查方法十分必要。

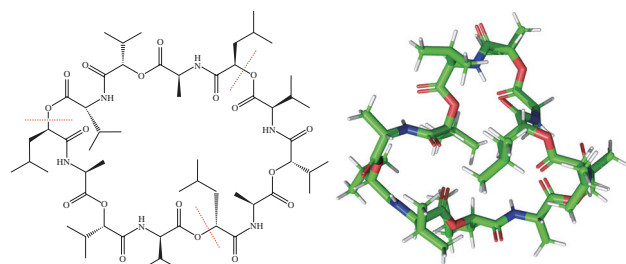


图1 Cereulide的结构示意图

Fig. 1 Chemical structure of cereulide

随着检测技术的发展, Cereulide的检测方法从早期不够准确且昂贵的动物实验法^[15]对其进行半定量, 到使用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 法^[16-17]对Bc毒株进行鉴定, 但无法定量测定, 再到准确的仪器分析方法。张秀尧等^[18]利用高效液相色谱-串联质

谱法可实现对食品中Bc呕吐毒素Cereulide的准确分析测定, 但此方法前处理复杂、基质效应明显, 需加入同位素内标方可达到精准检测; José等^[19]以苊酰亚胺为荧光探针和Cereulide竞争结合 K^+ 从而实现对Cereulide的定量分析测定, 此法操作简单, 但基质中其他离子对检测结果的干扰较大; Veronika等^[20]利用高效液相色谱-高分辨飞行时间质谱联合核磁共振法分析测定出Cereulide及其异构体的化学结构, 但无法进行定量测定。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 是一种新兴的软电离生物质谱^[21], 其灵敏度高、能够辅助被测物保持完整的分子结构, 可用于表征并量化各种分子质量的生物分子^[22-24], 近年来在多肽、蛋白质^[25-26]的筛选和测定中发挥了重要作用。Sebastian^[27]和Doellinger^[28]等均使用MALDI-TOF MS分析技术实现了对Cereulide的定性分析, 但无法进行定量检测。

本研究通过筛选MALDI-TOF MS传统基质对Cereulide的最佳响应强度, 简化食品样品前处理过程、优化分析方法, 实现大批量、多批次样品中Cereulide高效快速的定性、定量检测, 为调研、评价日常食物中Cereulide残留量及污染风险状况提供可靠的技术补充。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牛奶 市购; 米饭及面制品由当地餐饮店提供。

α -氰基-4-羟基肉桂酸 (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, HCCA)、芥子酸 (sinapic acid, SA)、2,5-二羟基苯甲酸 (2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB) (高效液相色谱级) 德国Bruker公司; Cereulide标准品 (2.0 mg/mL, 纯度99.0%, CAS号: 157232-64-9) 荷兰Chiralix公司; 甲醇、乙腈 (色谱纯) 美国Thermo Fisher Scientific

公司；三氟乙酸 (trifluoroacetic acid, TFA) 美国 Sigma 公司；其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

MS205DU 电子天平 梅特勒-托利多 (上海) 国际贸易有限公司；ultraflex extreme MALDI-TOF MS 仪 (配 384 孔 ground steel 靶板) 德国 Bruker 公司；2600TH 超声清洗仪 上海安谱科学仪器有限公司；M3 7610-33CN 涡旋混合仪 美国 Thermo Fisher Scientific 公司；Allegra X-30R 高速冷冻离心机 美国 Beckman 公司；Milli-Q 超纯水制备系统 美国 Millipore 公司。

1.3 方法

1.3.1 溶液配制

1.3.1.1 标准溶液的配制

准确移取 Cereulide 标准品溶液 50 μL 于 10 mL 容量瓶，用甲醇定容至刻度，得 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液，于 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 避光储存 6 个月；精密量取上述储备液 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容，得到 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准中间液，临用时将上述标准中间液用甲醇-水 (50:50, *V/V*) 稀释至指定标准曲线质量浓度。

1.3.1.2 基质的配制

称取适量传统基质 HCCA (SA 或 DHB) 至离心管中，加入 1.0 mL TA50 (乙腈-水 (1:1, *V/V*)) (含 0.1% TFA) 溶剂，配成对应的质量浓度 HCCA (SA 或 DHB) 基质溶液，超声溶解 10 min。

1.3.2 样品前处理

1.3.2.1 低脂肪制品

参考文献 [18] 前处理方法并作适当修改。称取 0.50 g 米饭或米面制品，加入 2 g 无水 Na_2SO_4 和 5.0 mL 甲醇后超声提取 10 min，经 8 000 r/min 离心 5 min 后移取上清液，残渣再用 5.0 mL 甲醇提取、离心 1 次，合并提取液后用甲醇定容至 10 mL，再吸取 5.0 mL 提取液，于 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 以氮气吹干，溶于 500 μL 甲醇-水 (50:50, *V/V*)，点靶上机测定。

1.3.2.2 乳制品

称 0.5 g 乳制品 (豆奶、牛奶、含乳饮料、奶粉等) 加入 1 mL 水后，再加入 0.5 mL 乙酸锌 (92 g/L) 和 0.5 mL 亚铁氰化钾 (183 g/L) 混匀，用甲醇定容至 10 mL 后旋涡 2 min，经超声提取 10 min 后 10 000 r/min 离心 5 min，吸取 5 mL 上清液， $55\text{ }^\circ\text{C}$ 以氮气吹至约 1 mL，再用 5 mL 正己烷萃取 2 次，合并上清液后转移至由 100 mg *N*-丙基乙二胺固相吸附剂、40 mg C_{18} 和 20 mg 石墨化碳黑吸附剂混合均匀的离心管，振摇 2 min，超声提取 5 min 后 10 000 r/min 离心 5 min，将上清液用甲醇-水 (50:50, *V/V*) 定容至 2 mL，点靶上机测定。

1.3.3 点靶方式与 MALDI-TOF MS 分析条件

1.3.3.1 点靶方式

按点靶方法 [29]，具体为双铺法 1：先移取 1 μL 样品于 384 孔 ground 靶板上，自然挥干后，再移取 1 μL 基质覆盖，自然挥干待测；双铺法 2：先移取 1 μL 基质于 384 孔

ground 靶板上，自然挥干后，再移取 1 μL 样品覆盖，自然挥干待测；混合点样法：取 2 μL 样品和 2 μL 基质混合均匀后，取 2 μL 混合物直接于 384 孔 ground 靶板上点样，自然挥干待测；三明治法：取 0.5 μL 基质溶液于 384 孔 ground 靶板上，自然挥干后，取 1 μL 样品覆盖基质，自然挥干后，再取 0.5 μL 基质溶液挥干待测。

1.3.3.2 MALDI-TOF MS 条件

光源：氮气激光；离子源：电喷雾电离源；波长：337 nm；检测模式：反射线性正离子模式；采集范围：100~1 500 Da；激光强度：70%；质谱响应强度叠加次数均为 20 次。

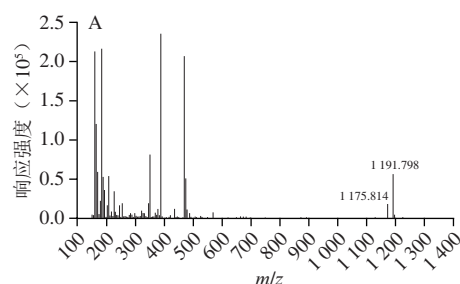
1.4 数据处理

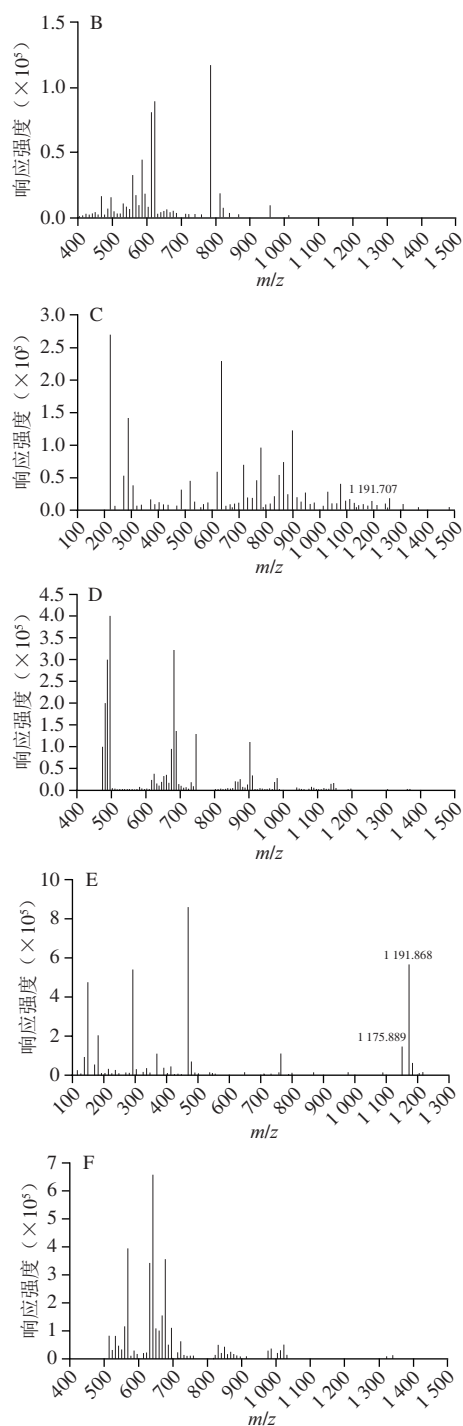
利用仪器配置的 flexControl 软件对质谱图质量轴质荷比 (*m/z*) 进行标记和默认平滑处理，并用 flexAnalysis 3.4 软件分析原始数据，根据叠加所得 Cereulide 对应 *m/z* 的峰面积换算成标准曲线中标准物质的含量。结果以平均值表示 ($n=6$)，并采用 Excel 2011 进行数据分析及图形绘制。

2 结果与分析

2.1 MALDI-TOF MS 裂解规律研究与基质选择

按 1.3.1 节中方法配制 100 ng/mL 的 Cereulide 标准溶液和 10 mg/mL 的 HCCA、SA 和 DHB 基质溶液，观察 Cereulide 标准溶液与基质的成膜过程及成膜情况，并分别采用反射线性正离子模式和反射线性负离子模式分析 Cereulide 在 3 种基质的 MALDI-TOF MS 响应情况，结果见图 2。结果表明，Cereulide 在 3 种基质的负离子模式均无法检测到目标物；以 HCCA 和 DHB 作为基质时，在正离子模式下可以检测到离子化形式为 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 和 $[\text{M}+\text{K}]^+$ 的 Cereulide 质谱峰，其 *m/z* 分别为 1 175.813 8 和 1 191.798 3，与 Sebastian 等 [27] 的分析结果一致，且以 DHB 为基质的叠加响应强度达 10^5 以上；以 SA 为基质时，仅在正离子模式下能检测到离子化形式为 $[\text{M}+\text{K}]^+$ 的质谱峰；以 DHB 为基质时，在正离子模式下可产生 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 和 $[\text{M}+\text{K}]^+$ 的质谱信号峰。但值得注意的是，在以 HCCA 为基质时，其在靶板上的成膜性、响应强度均优于 DHB，其原因是 DHB 与样品重结晶的“甜点”效应明显 [30-31]，故选用 HCCA 作为 Cereulide 的分析基质。





A. HCCA基质的线性正离子模式质谱图; B. HCCA基质的线性负离子模式质谱图; C. SA基质的线性正离子模式质谱图; D. SA基质的线性负离子模式质谱图; E. DHB基质的线性正离子模式质谱图; F. DHB基质的线性负离子模式质谱图。

图2 不同基质下Cereulide的MALDI-TOF MS图

Fig. 2 MALDI-TOF MS spectra of cereulide in different matrices

2.2 点靶方式的选择与基质溶剂优化

基质结晶质谱信号不稳定、响应重复性差和“甜点”效应是影响MALDI-TOF MS定量分析测定的关键问题^[30]。为实现HCCA对Cereulide的准确定量分析，以

HCCA为基质，通过考察不同点样方式对质谱信号的影响，即按1.3.3.1节中操作采用双铺法1、双铺法2、混合点样法和三明治法，将100 ng/mL的Cereulide标准溶液作为样品在384孔ground靶板上点样，每种方式做6次平行，并按1.3.3.2节仪器分析条件进行检测，结果见图3A。4种不同的点靶方式对Cereulide的[M+Na]⁺和[M+K]⁺的质谱峰响应强度从高到低依次为三明治法、双铺法2、双铺法1和混合点样法，且三明治法与双铺法2的响应强度平均值均介于0.57×10⁵~0.67×10⁵，但因实际操作过程中双铺法2的操作步骤少及所需等待时间远少于三明治法，可提高实验效率，因此选用双铺法2作为Cereulide的点靶方式。

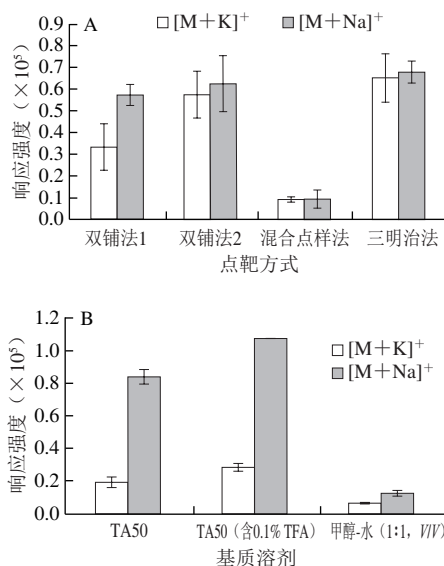


图3 HCCA在不同点靶方式下(A)和HCCA分散在不同溶剂(B) Cereulide质谱响应强度

Fig. 3 Mass spectral response intensity of cereulide with HCCA using different spotting methods (A) and HCCA dispersed in different solvents (B)

将HCCA分别按1.3.3.1节中方法分散在TA50、TA50(含0.1% TFA)和甲醇-水(1:1, V/V)溶剂后，分别观察其与100 ng/mL标准溶液点样成膜过程，并按1.3.3.2节仪器条件分析其响应强度，结果见图3B。结果表明，3种溶剂均可用于HCCA基质的溶解和MALDI-TOF MS分析，但在实际操作过程中发现甲醇-水所需的分散时间远多于其他2种溶剂；3种溶剂对Cereulide的[M+Na]⁺和[M+K]⁺的质谱峰响应强度从高到低依次为TA50(含0.1% TFA)、TA50和甲醇-水，且以TA50(含0.1% TFA)作为溶剂时，HCCA在ground靶板上可均匀铺展，分散性好、成膜性佳，Cereulide的质谱信号强度高重复性好，叠加的[M+Na]⁺质谱峰响应强度可达10⁵，故选用TA50(含0.1% TFA)作为HCCA溶剂。

2.3 基质浓度优化

在1 mL TA50(含0.1% TFA)中加入2.0、4.0、

6.0、8.0 mg和10.0 mg不同质量的HCCA基质，考察其对100 ng/mL Cereulide标准溶液的MALDI-TOF MS分析效果，结果见图4A。随着HCCA质量浓度的增加，Cereulide的 $[M+Na]^+$ 质谱信号强度呈现先增加后降低的趋势，在 $4.6 \times 10^4 \sim 1.4 \times 10^5$ 之间，且在6.0 mg/mL时达最大值，为 1.4×10^5 ；而Cereulide的 $[M+K]^+$ 质谱信号强度较为稳定，整体介于 $0.4 \times 10^5 \sim 0.5 \times 10^5$ ；说明基质浓度对 $[M+Na]^+$ 质谱峰信号影响较大，对 $[M+K]^+$ 质谱峰信号影响较小。因此，后续实验均采用6.0 mg/mL HCCA的TA50（含0.1% TFA）基质溶液。

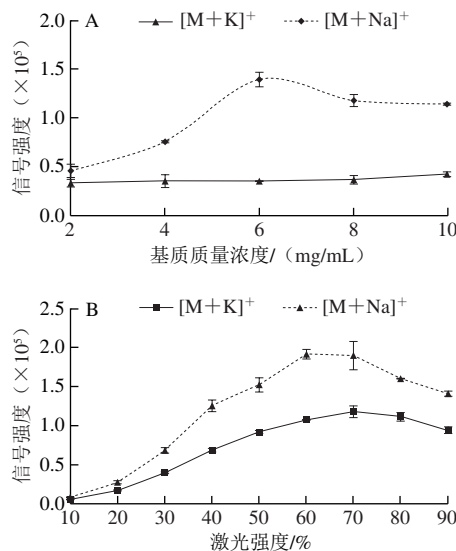


图4 不同质量浓度HCCA (A)和HCCA在不同激光强度下(B)的Cereulide质谱信号强度

Fig. 4 Mass spectral intensity of cereulide as a function of HCCA concentration (A) and laser intensity (B)

2.4 MALDI-TOF MS激光强度优化

以100 ng/mL的Cereulide标准溶液为样品，分析MALDI-TOF MS不同激光强度(10%~90%)对HCCA与Cereulide的共结晶物的质谱信号强度影响情况，以10%的能量间隔递增，各质谱信号响应强度的结果如图4B所示。结果表明，随着激光强度的增加， $[M+Na]^+$ 和 $[M+K]^+$ 的质谱离子峰响应强度也增加，即分别从 9.0×10^3 增加到 1.9×10^5 、 5.9×10^3 增加到 1.2×10^5 ，说明激光强度对两个目标质谱离子峰信号影响较大，且2个目标离子峰在激光强度达20%以上时信号较强。具体地，当激光强度增加到60%时， $[M+Na]^+$ 的响应强度达最大，当激光强度增加到70%时， $[M+K]^+$ 的响应强度达最大；当激光强度超过70%时，2个目标离子峰的信号强度均呈现下降趋势。故选择70%的激光强度作为MALDI-TOF MS对Cereulide的分析条件。

2.5 方法学评价

2.5.1 检出限、定量限和线性范围

按1.3.1节中方法配制标准曲线，以HCCA为基

质，采用双铺法2，在1.3.3.2仪器条件下对Cereulide的MALDI-TOF MS峰面积进行测定，绘制Cereulide的 $[M+Na]^+$ 和 $[M+K]^+$ 叠加峰面积(y)与标准物质质量浓度(x/(ng/mL))的线性曲线，线性范围、线性方程和相关系数见表1。在5~100 ng/mL的线性范围内，Cereulide的2个目标离子峰的叠加峰面积与质量浓度的r均>0.99，说明线性关系良好。本研究在信噪比 $R_{SN} \geq 3$ 条件下确定检出限(表1)，结果表明，以HCCA作为基质的MALDI-TOF MS对Cereulide的 $[M+Na]^+$ 和 $[M+K]^+$ 检出限分别为3.0 ng/g和5.0 ng/g。

表1 Cereulide的线性范围、线性方程和检出限

Table 1 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients and limits of detection and quantification for cereulide

离子化形式	线性范围/(ng/mL)	线性方程	相关系数(r)	检出限/(ng/g)	定量限/(ng/g)
* $[M+Na]^+$	5~100	$y=262.99x-1023.7$	0.998 6	3.0	10.0
$[M+K]^+$	5~100	$y=161.77x-864.54$	0.992 3	5.0	16.7

注：*定量离子。

2.5.2 加标回收实验和精密度结果

选择米饭和牛奶进行低、中和高3个质量浓度(即20、50 ng/g和100 ng/g)进行Cereulide加标回收实验。按1.3.2节方法制备样品，以HCCA为基质采用双铺法2，按照1.3.3.2节仪器方法上机测定，每个样品点靶6次，同时用外标法定量并计算回收率，结果见表2。结果表明，Cereulide在米饭和牛奶中的加标回收率为73.3%~118.2%，相对标准偏差为0.3%~10.9%，说明本研究建立的MALDI-TOF MS对Cereulide的定量分析检测方法准确可靠。

表2 Cereulide标准物质在低、中和高3个水平的加标回收率和相对标准偏差(n=6)

Table 2 Recoveries and relative deviations for cereulide at three spiked concentration levels (n=6)

样品名称	加标量/(ng/g)	回收率/%	相对标准偏差/%
米饭	20	112.4	9.6
	50	93.8	0.3
	100	82.1	1.1
牛奶	20	73.3	6.7
	50	87.2	8.4
	100	118.2	10.9

2.6 实际样品检测结果

将本方法用于广州市餐饮和销售环节中9批次米饭和6批次乳制品中Cereulide污染情况筛查和检测，通过比较实际样品在MALDI-TOF MS的质谱离子峰和信号强度进行筛查验证，检测结果表明，1批次米饭样品为阳性，其MALDI-TOF MS定量分析结果为 (10.3 ± 0.6) ng/g，阴性样品与阳性样品的MALDI-TOF MS图见图5。

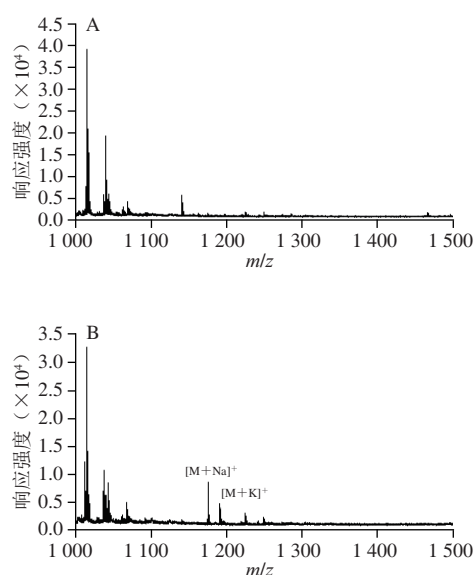


图5 米饭阴性(A)和阳性(B)样品的MALDI-TOF MS图
Fig. 5 MALDI-TOF MS spectra of negative (A) and positive (B) cooked rice samples

3 结论

通过优化基质和仪器分析条件,建立了以HCCA为基质的反向线性正离子模式定量测定蜡样芽孢杆菌呕吐毒素Cereulide的MALDI-TOF MS分析方法,将传统的Bc菌株定性检测方法转移到其确定蛋白质代谢物的定量分析检测,提高了对Cereulide污染准确性的判定。该方法不仅灵敏度高、筛查结果准确、精密度好、节能环保高效,而且不需要内标即可实现Cereulide的定性定量分析;同时,每个样品经仪器分析仅需0.3 s即获得筛查结果,可实现日常检验和应急抽检对大批量、多批次样品中Cereulide的定性筛查。

MALDI-TOF MS在生物毒素分析测定方面有巨大优势,目前已基本可以代替传统生化方法,通过优化样品净化条件也可为食品非法添加物的风险评估提供快速、准确和极其高效的筛查方法,但由于目前MALDI-TOF MS在生物毒素方面的数据库并不完整,因此不断完善此数据库或开发出不依赖数据库的鉴定方法是亟待解决的问题和研究方向。

参考文献:

- 贾伟娟,宋丽丽,张玲艳,等.蜡样芽孢杆菌毒素的最新研究进展[J].中国抗生素杂志,2022,47(6):534-542. DOI:10.13461/j.cnki.cja.007350.
- 郑庆芳,王东澍,吕宇飞,等.蜡样芽孢杆菌族毒素研究进展[J].微生物学杂志,2021,41(6):75-82.
- CARROLL L, WIEDMANN M, KOVAC J. Proposal of a taxonomic nomenclature for the *Bacillus cereus* group which reconciles genomic definitions of bacterial species with clinical and industrial phenotypes[J]. mBio, 2020, 11(1): 1-15. DOI:10.1128/mBio.00034-20.
- 王琼,马红梅,曾瑾,等.食源性蜡样芽孢杆菌的危害及其检测方法研究进展[J].中国食品卫生杂志,2021,33(5):633-637. DOI:10.13590/j.cjfh.2021.05.022.
- LAN X Y, WANG J Q, ZHENG N, et al. Prevalence and risk factors for *Bacillus cereus* in raw milk in Inner Mongolia, Northern China[J]. International Journal of Dairy Technology, 2018, 71: 269-273. DOI:10.1111/1471-0307.12416.
- CHON J, YIM J, KIM H, et al. Quantitative prevalence and toxin gene profile of *Bacillus cereus* from ready-to-eat vegetables in South Korea[J]. Foodborne Pathogens & Disease, 2015, 12: 795-799. DOI:10.1089/fpd.2015.1977.
- PERERA M, RANASINGHE G. Prevalence of *Bacillus cereus* and associated risk factors in Chinese-style fried rice available in the city of Colombo, Sri Lanka[J]. Foodborne Pathogens & Disease, 2012, 9: 125-131. DOI:10.1089/fpd.2011.0969.
- YU S B, YU P F, WANG J, et al. A study on prevalence and characterization of *Bacillus cereus* in ready-to-eat foods in China[J]. Front in Microbiology, 2020, 10: 3043. DOI:10.3389/fmicb.2019.03043.
- LIU X Y, HU Q, XU F, et al. Characterization of *Bacillus cereus* in dairy products in China[J]. Toxins, 2020, 14, 12(7): 454-471. DOI:10.3390/toxins12070454.
- VANGOITSENHOVEN R, RONDAS D, CRÈVECOEUR I, et al. Foodborne cereulide causes beta-cell dysfunction and apoptosis[J]. PLoS ONE, 2014, 9(8): e104866. DOI:10.1371/journal.pone.0104866.
- KATIA R, KATHARINA S, UTE M, et al. Why be serious about emetic *Bacillus cereus*: cereulide production and industrial challenges[J]. Food Microbiology, 2020, 85: 103279. DOI:10.1016/j.fm.2019.103279.
- RAJKOVIC A, UYTENDAELE M, VERMEULEN A, et al. Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide[J]. Letters in Applied Microbiology, 2008, 46(5): 536-541. DOI:10.1111/J.1472-765X.2008.02350.x.
- 王霄晔,任婧寰,王哲,等.2017年全国食物中毒事件流行特征分析[J].疾病监测,2018,33(5):359-364.
- SIELE C, NICO B, MIEKE U. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2013, 84: 433-450. DOI:10.1111/1574-6941.12110.
- ELINA J, VERA V, MARIA A, et al. *In vitro* assay for human toxicity of cereulide, the emetic mitochondrial toxin produced by food poisoning *Bacillus cereus*[J]. Toxicology in Vitro, 2003, 17: 737-744. DOI:10.1016/S0887-2333(03)00096-1.
- MARYAM S, HEDAYAT H, ZAHRA P, et al. Prevalence, molecular identification and characterization of *Bacillus cereus* isolated from beef burgers[J]. Journal of Food Safety, 2018, 38(1): e12414. DOI:10.1111/jfs.12414.
- ZEINAB I, MOHAMED A, MOHAMED S, et al. Microbiological evaluation of infant foods quality and molecular detection of *Bacillus cereus* toxins relating genes[J]. Toxicology Reports, 2018, 5: 871-877. DOI:10.1016/j.toxrep.2018.08.013.
- 张秀尧,蔡欣欣,李毅.超高效液相色谱串联质谱法检测食品中蜡样芽孢杆菌呕吐毒素Cereulide[J].分析化学,2012,40(8):1267-1273.
- JOSÉ G, SATURNINO I, EVA-CLARA A, et al. Potassium-ion-selective fluorescent sensors to detect cereulide, the emetic toxin of *B. cereus*, in food samples and HeLa cells[J]. Chemistry Open, 2017, 6: 562-570. DOI:10.1002/open.201700057.

- [20] VERONIKA W, MARKUS K, MONIKA E, et al. Structure revision of isocereulide A, an isoform of the food poisoning emetic *Bacillus cereus* toxin cereulide[J]. *Molecules*, 2021, 26: 1360. DOI:10.3390/molecules26051360.
- [21] 闫雯倩, 陈企发, 夏炎. 基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱(MALDI-TOFMS)在微生物鉴定中的应用[J]. *化学教育(中英文)*, 2022, 43(10): 7-14. DOI:10.13884/j.1003-3807hxjy.2021040081.
- [22] KAILASA S, KODURU J, BAEK S, et al. Review on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the rapid screening of microbial species: a promising bioanalytical tool[J]. *Microchemical Journal*, 2020, 159(1): 105387. DOI:10.1016/j.microc.2020.105387.
- [23] WANG W, KALUZA A, NOUTA J, et al. High-throughput glycopeptide profiling of prostate-specific antigen from seminal plasma by MALDI-MS[J]. *Talanta*, 2021, 222: 121495. DOI:10.1016/j.talanta.2020.121495.
- [24] MAREK Š. Analysis and sequencing of nucleic acids by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry[J]. *Spectroscopy Europe/World*, 2016, 28(5): 11-15.
- [25] CHOU C, CHEN H, HSIAO H. Rapid analysis of ketamine with in-house antibody conjugated boronic acid modified silver chip on MALDI-TOFMS measurement[J]. *Talanta*, 2021, 226: 122115. DOI:10.1016/j.talanta.2021.122115.
- [26] 李大鹏, 谢光珊, 谢佩斯, 等. 两性离子双功能化超亲水金属有机框架纳米复合材料的制备及其用于糖肽的选择性富集[J]. *色谱*, 2021, 39(3): 205-210.
- [27] SEBASTIAN U, CHRISTOPH G, RICHARD D, et al. Identification of cereulide producing *Bacillus cereus* by MALDI-TOF MS[J]. *Food Microbiology*, 2019, 82: 75-81. DOI:10.1016/j.fm.2019.01.012.
- [28] DOELLINGER J, SCHNEIDER A, STARK T, et al. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for rapid detection of cereulide from *Bacillus cereus* cultures[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 511674. DOI:10.1101/869958.
- [29] 赵玥祯, 徐杨, 龚灿, 等. 纳米四氧化三铁基质用于基质辅助激光解吸电离质谱法分析小分子化合物[J]. *分析化学*, 2021, 49(1): 103-112. DOI:10.19756/j.issn.0253-3820.201391.
- [30] BANAZADEH A, PENG W J, VEILLON L, et al. Carbon nanoparticles and graphene nanosheets as MALDI matrices in glycomics: a new approach to improve glycan profiling in biological samples[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2018, 29(9): 1892-1900. DOI:10.1007/s13361-018-1985-z.
- [31] 陈思键, 赵幻希, 吴冬雪, 等. 多壁碳纳米管基质用于大气压基质辅助激光解吸电离质谱分析小分子化合物[J]. *质谱学报*, 2021, 42(4): 362-371.